

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß zur Bestimmung der Absorptionsrate eines Stoffes lediglich der Vergleich der Flächen unter den Kurven nach intravenöser und nach nicht-intravenöser Gabe derselben Dosis bei derselben Versuchsperson nötig ist.

Die Relation der Flächen entspricht der Absorptionsrate. Damit ist das Verfahren zur pharmakokinetischen Prüfung der Vollständigkeit der Absorption geeignet und experimentell bestätigt.

Literatur

1. DOST, F. H., Klin. Wschr. II, 655 (1958). — 2. DOST, F. H., Antibiotica et chemotherapia, im Druck. — 3. DOST, F. H., Dtsch. med. Wschr. II, 1833 (1962). — 4. MOELLER, J. und L. ABT, Klin. Wschr. I, 340 (1952). — 5. GLADTKE, E. und E. MOHOS, Veröffentlichung in Vorbereitung. — 6. SCHMIDT, K., S. TRIPOD und F. GROSS, Klin. Wschr. 38, 862 (1960). — 7. BRATTON, A. C. und E. K. MARSHALL, J. Biol. Chem., Baltimore, 128, 537 (1939). — 8. MATTENHEIMER, H., Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1961), S. 9—12.

Professor Dr. F. H. Dost
Direktor der Universitätskinderklinik
63 Gießen, Klinikstr. 28

Untersuchungen über das Verhalten der Plasmalipoide bei idiopathischer Hypercholesterinämie, unter besonderer Berücksichtigung der Cholesterinester¹⁾

Von

NEPOMUK ZÖLLNER

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Seitz)

(Der Schriftleitung zugegangen am 1. September 1962)

Es wird ein System von Lipoidanalysen beschrieben, das es gestattet, aus einem Lipoidextrakt von 1 ml Serum alle wesentlichen Lipoidgruppen mit Ausnahme der freien Fettsäuren im Doppel zu bestimmen. Die Analyse der Cholesterinester bei Fällen von idiopathischer Hypercholesterinämie ergibt eine normale Verteilung der Cholesterinesterfettsäuren. Dies wird als Beweis dafür angesprochen, daß eine Störung des Cholesterinesterstoffwechsels bei der idiopathischen Hypercholesterinämie nicht vorliegt. Eine vergleichende Untersuchung über die quantitative Bestimmung der Cholesterinester mittels Dünnschicht- oder Gaschromatographie ergibt gute Übereinstimmung beider Methoden.

A method is described by which all important groups of lipids except free fatty acids can be determined in duplicate in the lipid extract from 1 ml serum. The analysis of cholesterol esters in idiopathic hypercholesterolaemia gives a normal distribution of cholesterol fatty acids. This is evidence that cholesterol ester metabolism is not disturbed in idiopathic hypercholesterolaemia. Comparison of quantitative cholesterol ester determination by thin layer and gas chromatography shows good agreement.

Die idiopathische familiäre Hypercholesterinämie ist eine angeborene Stoffwechselstörung auf der Grundlage eines genetischen Defektes. Die Grundzüge der Klinik dieser nicht allzu seltenen Krankheit sind durch die klassischen Beschreibungen von THANNHAUSER und MAGENDANTZ (1) sowie THANNHAUSER (2) dargestellt. Auch die Genetik ist weitgehend bekannt (FREDRICKSON (3)), wenngleich die erhobenen Befunde noch nicht einheitlich gedeutet werden. Die Abgrenzung der Krankheit gegen die idiopathische Hyperlipämie macht nur gelegentlich noch Schwierigkeiten.

Über die Natur des der idiopathischen familiären Hypercholesterinämie zugrundeliegenden Stoffwechseldefektes ist man noch völlig im Dunkeln. Dies ist verständlich, weil bislang nur bekannt ist, daß Cholesterin und die Summe seiner Ester in normalen Proportionen vermehrt sind (2). Daneben beobachtet man eine Vermehrung der Phosphatide (3, 4, 5) und — häufig — der Carotinoide (6). Alle Angaben über Lipoidvermehrungen bei der Krankheit beziehen sich also auf Substanzgruppen. Hinweise auf die Lage eines Stoffwechselblocks sind aber erfahrungsgemäß in erster Linie aus der Anhäufung einer individuellen Substanz zu erwarten. Daraus ergibt sich die Forderung, die Analytik bis zur Bestimmung einzelner Lipide voranzutreiben. Ent-

¹⁾ Dem Andenken meines verehrten Lehrers SIEGFRIED J. THANNHAUSER, gestorben am 18. Dez. 1962, gewidmet.

sprechende Untersuchungen auf dem Gebiet der Cholesterinester sind daher Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Methodik

A. Allgemeine Methoden zur Analyse der Plasmalipide¹⁾

Venenblut wird morgens vom nüchternen Patienten gewonnen. Durch Rückfrage wird sichergestellt, daß die Mahlzeit des Vorabends nicht fettreich war. Sobald wie möglich, jedenfalls innerhalb weniger Stunden wird abzentrifugiert und Serum vom Blutkuchen abgetrennt. Hämolytisches Serum wird verworfen. Für säulen- und gaschromatographische Untersuchungen wird Heparin- oder Oxalatplasma durch Zentrifugieren bei 3°–5° sofort nach Blutabnahme gewonnen. Auf die Ergebnisse bezüglich Cholesterin und Cholesterinester hat dieses Vorgehen keinen erkennbaren Einfluß.

Die Messung der lipämischen Trübung erfolgt entweder mit Rotfilter 691 im Eppendorf-Photometer oder bei 691 m μ in einem Spektrophotometer (d = 1 cm, Vergleichslösung H₂O). Die Ergebnisse mit Filter- und Spektrophotometer sind nicht vergleichbar aber Extinktionswerte über $\epsilon = 0,1$ weisen jedenfalls auf erhöhte Neutralfettwerte hin, meist verursacht durch eine fettreiche Mahlzeit am Vorabend. Eine Wiederholung aller Lipoidbestimmungen nach einem Tag zuverlässig fettarmer Ernährung ist dann angezeigt.

Die Herstellung eines Lipoidextraktes aus dem Serum erfolgt durch tropfenweise Zugabe von 1 ml Serum (oder Plasma) zu 16 ml Chloroform-Methanol 1:1 (v:v). Es wird im Wasserbad kurz zum Sieden gebracht, nach Abkühlen mit Chloroform auf 25 ml aufgefüllt und durch ein schnellaufendes Filter (Abdeckung mit Uhrglas) filtriert. Diese Art der Extraktion mit Chloroform-Methanol (Endverhältnis 2:1 (v:v)) erfäßt die Plasmalipide quantitativ. Sie ist unter Beibehaltung der Mengenverhältnisse auch für größere Serumproben geeignet. Ob die kurze Erhitzung und die Lösungsmittelmenge auch für Organhomogenate ausreicht, ist jeweils zu prüfen.

Die Reinigung des Lipoidextraktes erfolgt, in Anlehnung an eine Methode von FOLCH, mitgeteilt von SPERRY (7), durch Ausschütteln von 20 ml filtriertem Lipoidextrakt mit 4 ml 0,02% wäßriger CaCl₂-Lösung in einem graduieren Schüttelzylinder von 25 ml. Durch Zugabe des Wassers entsteht eine obere Wasser-Methanol-Phase, die alle nichtlipoiden Verunreinigungen aufnimmt (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Elektrolyte). Durch den Gehalt an CaCl₂ werden Phosphatidverluste in die obere Phase vermieden. Das Volumen der unteren, lipoidhaltigen Phase (kurz „untere Phase“) beträgt etwa 14 ml; es wird auf 0,1 ml genau abgelesen und notiert. Die obere Phase wird quantitativ abgesaugt, gegebenenfalls unter Verlust von etwas unterer Phase. Von der unteren Phase werden aliquote Teile genommen, eingeeengt und in die weiteren Analysen eingesetzt.

Bei allen Arbeiten mit Lipoidlösungen ist die Flüchtigkeit der Lösungsmittel in Rechnung zu stellen. Prinzipiell sind leichtflüchtige Lösungsmittel für Mikromethoden ungeeignet. Daher haben wir aufgehört, Äther zu verwenden. Es ist darauf zu achten, daß Gefäße vor der Entnahme aliquoter Teile weitgehend gefüllt und gut verschlossen sind (außer zum Erhitzen, das wir aber so weit wie möglich vermeiden). Bei längerer Aufbewahrung von Lipoidlösungen ist immer mit Volumenverlusten zu rechnen; ist eine längere Aufbewahrung nicht zu umgehen, so ist bis zu dem ursprünglichen Volumen aufzufüllen. Wegen der Neigung von Lipoidlösungsmitteln zu „kriechen“ ist es zweckmäßig, immer verhältnismäßig große Volumina zu pipettieren und erst anschließend einzuengen; im allgemeinen arbeiten wir mit Volumen von wenigstens 1 ml, gegebenenfalls nach Vorverdünnung. Bei Verwendung von Mikropipetten können Meßungenauigkeiten durch Pipettierverlust sehr beträchtlich werden.

Das Einengen der Lipoidextrakte erfolgt auf dem Wasser- oder Sandbad bei Temperaturen knapp über dem Siedepunkt der verwendeten Lösungsmittel. Kochende Wasserbäder sind, auch wegen der Bildung von Kondenswasser in den Probengläsern, zu vermeiden. Die letzten Lösungsmittelreste werden mit einem Stickstoffstrom verjagt. Große Lösungsmittelmengen verdampfen wir im Vakuum. Für viele Routineuntersuchungen (Gesamtcholesterin, Lipoidphosphor) ist die Anwendung von Stickstoff nicht nötig, wenn darauf geachtet wird, daß der Trockenrückstand nicht weiter erhitzt wird. Es ist darauf zu achten, daß die eingetrockneten Lipide umgehend im nächsten Lösungsmittel aufgenommen werden.

Die im folgenden empfohlenen Methoden wurden im Hinblick auf größtmögliche Spezifität bei Einsatz kleiner Substanzmengen ausgewählt. Alle zusammen können als Doppelbestimmungen aus der unteren Phase eines Lipoidextraktes von 1 ml Serum durchgeführt werden. Die Bestimmung des Cholesterins erfolgt nach ZAK u. M. (8,9) mit Hilfe der Eisenchloridreaktion (LIFSCHÜTZsche Reaktion). Der Vorteil dieser Reaktion gegenüber der LIEBERMANN-BURCHARDSchen Reaktion besteht in einer größeren Empfindlichkeit und einer größeren Stabilität der gebildeten Farbe. Wie wir uns durch Kontrolluntersuchungen vergewissern konnten, ist die Reaktion bei Anwendung auf einen in der beschriebenen Weise gereinigten Serumlipoidextrakt für Cholesterin selektiv. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins erübrigt sich damit die Digitoninfällung. Für die Eisenchloridmethode sind mehrere Modifikationen angegeben worden. Am einfachsten ist es, den zu untersuchenden trockenen Lipoidrückstand in 3 ml Eisessig zu lösen, mit 2 ml Reagenz (zu 7,5 ml konzentrierter Schwefelsäure gibt man 0,5 ml 10% wäßrige FeCl₃-Lösung und füllt nach Mischen auf 50 ml mit konzentrierter Schwefelsäure auf) zu unterschichten, sehr rasch zu mischen und nach 1/2 bis 1 Std. bei 560 m μ (oder im Eppendorf-Photometer, Filter 546) zu photometrieren. Ein Standardwert mit 50 μ g Cholesterin in 3 ml Eisessig wird parallel bestimmt, und gibt, je nach Photometer, in der 1 cm Küvette Extinktionswerte zwischen 0,240 und 0,290. Dementsprechend setzt man für Gesamtcholesterinbestimmungen 1 ml untere Phase, für Bestimmungen des freien Cholesterins 2 ml untere Phase ein. Bei Seren mit hohen Cholesterinwerten ist für die Gesamtcholesterinbestimmung eine Vorverdünnung nötig. Die Bestimmung des freien Cholesterins erfolgt nach Digitoninfällung unter präziser Einhaltung der Originalangaben von ZAK und Mitarbeitern.

Auf eine quantitative Entfernung des Digitoninüberschusses ist zu achten, da diese Substanz mit LIFSCHÜTZ-Reagenz ebenfalls eine Farbe gibt, die bei der angewandten Wellenlänge schwach absorbiert.

Lipoidphosphor wird durch Veraschung des trockenen Lipoidrückstandes und anschließende Entwicklung von Phosphormolybdänblau nach BARTLETT (10) bestimmt. Die Methode ist eine Modifikation der von FISKE und SUBBAROW angegebenen, erlaubt aber den Nachweis kleinerer Phosphormengen. Vorteilhaft ist die bequeme Veraschung im Brutschrank bei 160°, die abgesehen von einer einmaligen Unterbrechung zur Zugabe von Wasserstoffperoxyd keine Kontrolle erfordert. Ein

¹⁾ Die ausführliche Beschreibung der z. T. bereits an anderen Orten publizierten Methodik erfolgt auf Wunsch der Schriftleitung.

Standardwert von $2\text{ }\mu\text{g}$ Orthophosphatphosphor ergibt bei $830\text{ m}\mu$ Extinktionswerte von $\varepsilon = 0,300\text{--}0,350$ ($d = 1\text{ cm}$) nach Abzug des Leerwertes. Da die Methode sehr empfindlich ist, sollte nur mit gesondert, mit Bichromatschwefelsäure gewaschenen Gläsern gearbeitet werden. Mehrfache Leerwertmessungen dienen der Kontrolle von Gläsern und Reagentien; gute Leerwerte liegen unter $\varepsilon \leq 0,020$. Für die Gesamtphosphatidbestimmung verdünnt man 2 ml untere Phase mit 2 ml Chloroform und setzt 1 ml des Gemisches ein. Bei sehr hohen Phosphatidspiegeln ist stärker vorzuerdünnen, da die Eichkurve der Methode bei $\varepsilon \geq 0,700$ abzuflachen beginnt.

Die Bestimmung der *veresterten Fettsäuren* erfolgt nach RAPPORT und ALONZO (11). Als Standard wird Triolein Merck verwendet. $d = 1\text{ cm}$, $\lambda = 530\text{ m}\mu$, $450\text{ }\mu\text{g}$ Triolein ergeben eine Extinktion von $\varepsilon = 0,265$. Dementsprechend werden $1\text{ bis }2\text{ ml}$ untere Phase eingesetzt. *Gesamtlipide* werden mit der Sulphosphovanillin-Reaktion nach CHABROL u. Mitarb. (12, 13) in der Modifikation von ZÖLLNER und KIRSCH (14) bestimmt. Die Methode, die wahrscheinlich Doppelbindungen in den Lipiden erfaßt, ergibt bei Einsatz von $50\text{ }\mu\text{g}$ Gesamtlipiden aus Serum bei $530\text{ m}\mu$ Extinktionswerte zwischen $0,250$ und $0,300$ in der 1 cm -Küvette. Dementsprechend wird für eine Gesamtlipoidbestimmung 1 ml einer $1:10$ Verdünnung der unteren Phase eingesetzt. Eine Eichung der Methode ist nicht möglich, da ein heterogenes Gemisch bestimmt wird. Verschiedene Möglichkeiten, die Methode zu standardisieren sind an anderer Stelle (14) besprochen.

Je nachdem, ob als Maß für die Gesamtlipide die veresterten Fettsäuren bestimmt werden oder die Sulphosphovanillin-Reaktion durchgeführt wird, werden für eine *Analyse aller Lipoidgruppen* 9 bzw. 12 ml untere Phase verbraucht, lediglich die freien Fettsäuren bleiben ununtersucht. Der Rest der unteren Phase kann für Dünnschichtchromatographie verwendet werden. Neutralfette werden aus den Ergebnissen der übrigen Analysen berechnet. Geht man von einer Bestimmung der *veresterten Fettsäuren* aus, so lautet die Formel (15), unter Berücksichtigung neuerer Angaben von EGGSTEIN (16), (alle Werte in $\text{mg}\%$):

$$\text{Neutralfett} = 1,04 \times [\text{veresterte Fettsäuren} - (0,72 \times \text{Estercholesterin} + 13,3 \times \text{Lipoidphosphor})]$$

Unter Zugrundelegung von Gesamtlipoidwerten lautet die Gleichung (14), (alle Werte in $\text{mg}\%$):

$$\text{Neutralfette} = \text{Gesamtlipide} - (\text{Freies Cholesterin} + 1,7 \times \text{Estercholesterin} + \text{Phosphatide})$$

Ein *Berechnungsbeispiel* sei für den Lipoidphosphor angegeben: Die Doppelanalyse von $0,5\text{ ml}$ unterer Phase (1 ml einer $1:2$ Verdünnung) ergab eine Extinktion von $0,274$ und $0,266$. Nach Abzug des Leerwertes von $0,017$ und Mittelung ergibt sich ein Wert von $0,253$, dessen Umrechnung mit einem Eichwert für $2\text{ }\mu\text{g}$ von $0,336$ einen Phosphorgehalt von $1,5\text{ }\mu\text{g}$ ergibt. Dieser Wert wird mit dem Faktor 2 (Verdünnung), dem Volumen der unteren Phase ($14,1\text{ ml}$) und mit $1,25$ (Umrechnung auf 1 ml Serum) multipliziert. Daraus ergibt sich, daß 1 ml Serum

$$1,5 \times 2 \times 14,1 \times 1,25 = 53\text{ }\mu\text{g Lipoidphosphor}$$

enthielten. Das Serum enthielt also $5,3\text{ mg}\%$ Lipoidphosphor. Umrechnung mit dem Faktor 25 ergibt einen Phosphatidgehalt von $132\text{ mg}\%$.

B. Spezielle chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographische Trennungen der Cholesterinester erfolgten wie bereits beschrieben (17, 18), ebenso die quantitative Auswertung (18). Die Dünnschichtchromatographie der neutralen Lipoidfraktionen erfolgte mit Fließmittel B nach ZÖLLNER und WOLFRAM (19), bestehend aus

Petroläther:Äthylmethylketon:Eisessig $95:4:1$ (v:v:v).

Die *Abtrennung der Cholesterinester von den übrigen neutralen Plasmalipiden*, die Reinheitsprüfung der Fraktion, die Methyilveresterung und die anschließenden *Gaschromatographien* (vor und nach Hydrierung) werden an einem typischen Arbeitsgang erläutert:

Die untere Phase eines Chloroform-Methanol-Extraktes von 3 ml Serum wurde im Vakuum zur Trockene gebracht; Wasserreste wurden nach Zugabe geringer Mengen Äthanol verjagt. Anschließend wurde sofort in 1 ml Petroläther ($K_p 40\text{--}70^\circ$) aufgenommen.

Eine Florisil-Säule nach CARROL (20) wurde mit nicht desaktiviertem Florisil bereitet (15 g Florisil, Säulendurchmesser 12 mm). Die Petroläther-Lösung der Plasmalipide wurde auf die Säule aufgetragen; mit $4 \times 1\text{ ml}$ -Portionen wurde quantitativ nachgespült. Die Chromatographie erfolgte mit 50 ml Petroläther, 200 ml 50% Äther in Petroläther, 100 ml 25% Äther in Petroläther. Die fraktionierte Sammlung des Eluates erfolgte in 5 ml Portionen. Das Chromatogramm (Abb. 1) zeigt eine hinreichende Trennung des Cholesterinestergipfels von allen übrigen Lipiden. Eine Tüpfelprobe, bei der

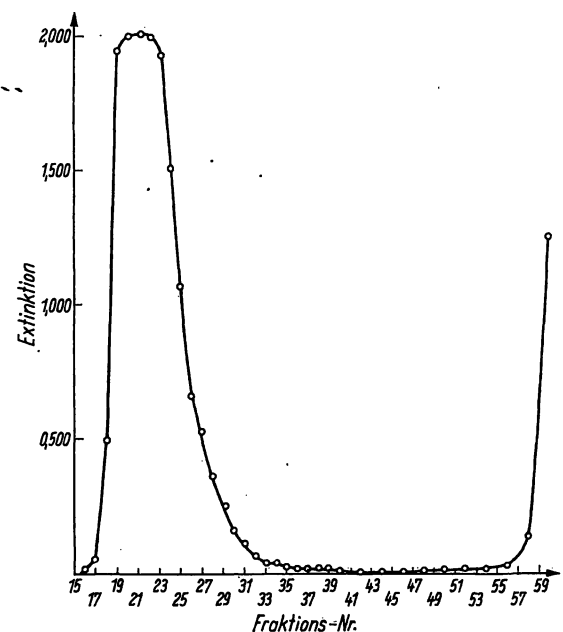


Abb. 1

Säulenchromatographische Trennung der Cholesterinester von den neutralen Lipiden. Lipoidbestimmung mit Hilfe der SPV-Reaktion. $\varepsilon = 0,100$ entspricht $\sim 50\text{ }\mu\text{g}$ Fraktion.

Die völlige Lipoidfreiheit der Fraktionen $40\text{--}47$ schließt eine Kontamination der Cholesterinester durch andere Lipide aus

aus jeder Fraktion jeweils ein Tropfen auf einer Dünnschichtplatte mit Antimontrichlorid gefärbt wurde, brachte das gleiche Ergebnis. Eine Dünnschichtchromatographie der vereinten Gipfel (Glas 17—34 und 53—69) ergab, daß der erste Gipfel ausschließlich Cholesterinester, und zwar in den Proportionen des Ausgangsgemisches enthielt (Abb. 2a), der zweite Gipfel die übrigen neutralen Lipoidfraktionen, nämlich Triglyceride und freies Cholesterin.

Nach unserer Erfahrung mit der chromatographischen Trennung der neutralen Lipide nach LIPSKY und Mitarbeitern (21) ist die von uns gewählte chromatographische Trennung an Florisil nach CARROL (20) der Methode von LIPSKY an Kieselsäure vorzuziehen. Trotz geringeren Säulendurchmessers ist die Fließgeschwindigkeit durch die Florisil-Säule wesentlich größer und damit die benötigte Zeit kürzer. Außerdem sind die zur Elution aufeinanderfolgender Fraktionen notwendigen Erhöhungen der Konzentration von Äther in Petroläther in der Florisil-Säule wesentlich größer als in der Kieselsäure-Säule; so werden Triglyceride in der

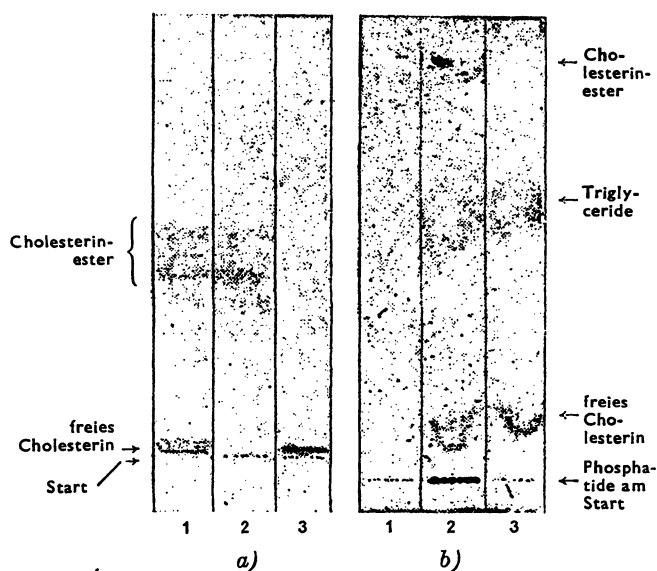


Abb. 2

Dünnschichtchromatographische Trennung der Cholesterinester von den übrigen Lipiden

a. Chromatogramm der Cholesterinester nach (18):

- 1: Gesamtlipoidextrakt
- 2: Cholesterinester nach Säulenchromatographie
- 3: Zweite neutrale Lipoidfraktion nach Säulenchromatographie (Gemisch aus

Triglyceriden und freiem Cholesterin). In Bahn 1 und 2 ist die kleine 5. Fraktion (PF) photographisch schwer darstellbar.

b. Chromatogramm der Gesamtlipide (19): (Fließmittel Petroläther: Äthylmethylketon: Eisessig 95:4:1; Nachweis mit konzentrierter Schwefelsäure und Veraschen)

- 1: Cholesterinester nach Säulenchromatographie
- 2: Gesamtlipoidextrakt
- 3: Zweite neutrale Lipoidfraktion nach Säulenchromatographie.

Florisil-Säule durch eine Erhöhung der Konzentration von 50% Äther auf 150% Äther eluiert, während in der Kieselsäure-Säule die Triglyceride bereits durch eine Konzentrationserhöhung von 10% auf 30% Äther eluiert werden. Die Cholesterinesterfraktion wurde zur Trockene eingengt und nach Zugabe von 40 ml 50% methanolischer Salzsäure 9 Stunden bei 80° zur Methylveresterung am Rückflußkühler gekocht. Anschließend wurde nach Zugabe einer geringen Menge Wasser

6 mal mit Petroläther:Äther 1:1 ausgeäthert, die vereinigten Ätherextrakte wurden mit halbgesättigter Bicarbonatlösung, anschließend mit Wasser, säurefrei gewaschen. Über Natriumsulfat wurde über Nacht getrocknet. Eine dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte keine Cholesterinester mehr.

Die Isolierung der Methylester der Fettsäuren aus den Cholesterinestern erfolgte wiederum an der Florisil-Säule. Der Vorlauf mit 60 ml Petroläther enthielt bereits eine mit Antimontrichlorid anfärbbare Fraktion, die aber sicher nicht mit den natürlichen Cholesterinestern identisch ist, sondern ein Reaktionsprodukt mit der methanolischen Salzsäure, möglicherweise Cholesterylchlorid, darstellt. Dieses Reaktionsprodukt, dessen Abtrennung vor Einsatz der Methylester in die Gaschromatographie ratsam ist, läuft bei der Dünnschichtchromatographie der Cholesterinester (18) bis zur Lösungsmittelfront und kann dadurch leicht identifiziert werden. Die Methylester wurden mit 50% Äther in Petroläther eluiert; am einfachsten wird ihr Erscheinen durch Tüpfeln auf Dünnschichtplatten und Nachweis nach Besprühen mit konzentrierter oder 50%iger Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen auf 160° festgestellt. Die Methylester wurden zur Trockene gebracht und in kleinsten Mengen Aceton oder Methanol aufgenommen. Die anschließende Gaschromatographie erfolgte an Bernsteinsäure-Butandiol-Polyester- und Bernsteinsäure-Äthylenglykol-Polyester-Säulen, präpariert nach den Angaben von CRAIG und MURTY (22) am Fraktometer 116 E (Perkin-Elmer) bei 198° mit Helium als Trägergas, Strömungsgeschwindigkeit 120 ml/min. Der Nachweis der Fraktionen erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor. Ein Teil der Methylester wurde in methanolischer Lösung über Palladiumkohle hydriert; anschließend wurde filtriert, eingengt und in die Gaschromatographie eingesetzt.

Ergebnisse

Typische Befunde für die idiopathische Hypercholesterinämie finden sich in Tabelle 1. Hier ist das Verhalten der Plasmalipide eines Patienten (Fall So.) im Verlaufe von 10 Monaten dargestellt. Man erkennt die Erhöhung des Gesamtcholesterins, der Phosphatide, den normalen Esterquotienten, eine leichte Erhöhung der Neutralfette, die sich auch in der Serumtrübung ausdrückt; man erkennt ferner das weitgehend parallele Verhalten von Cholesterin und Phosphatiden. Der Verlauf in den ersten vier Monaten zeigt die Auswirkungen einer sehr fettarmen, auf Pflanzenöle umgestellten Kost, durch die der Cholesterinspiegel vorübergehend in den Normalbereich gesenkt werden konnte. Die späteren Werte sind z. T. durch ungenügende Einhaltung des Kostplanes zu erklären; spontane Schwankungen sind aber nicht auszuschließen.

Tabelle 2 gibt die quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen der Cholesterinester wieder. Bei allen Patienten, die (mit Ausnahme von Po. und Wa.) typische hypercholesterinämische Xanthome aufwiesen, lag die Verteilung der Cholesterinester im

Tab. 1
Chemische Verlaufsbeschreibung des Falles So. (idiopathische Hypercholesterinämie)
(Diät, keine medikamentöse Therapie)

Datum	17. 8.	23. 8.	30. 8.	6. 9.	13. 9.	28. 9.	19. 10.	30. 11.	5. 1.1)	4. 2.	27. 4.	18. 5.	28. 5.
Trübung	1,160	—	0,292	0,355	0,375	0,410	—	—	0,270	0,225	0,540	0,248	0,453
Gesamtcholesterin mg%	764	793	520	476	504	582	457	306	596	310	452	518	455
Freies Cholesterin mg%	258	256	160	192	186	208	139	104	200	80	140	180	141
Ester-Cholesterin mg%	506	537	360	284	318	374	323	202	296	230	312	338	314
Esterquotient %	66	68	69	60	59	64	71	66	60	74	69	65	69
Phosphatide mg%	462	485	380	445	—	—	—	—	359	—	341	361	347
Veresterte Fettsäuren mg%	1002	1020	918	1110	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gesamtlipide mg%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1760	1650	1740
Neutralfett errechnet, mg%	407	371	476	698	—	—	—	—	—	—	749	535	718

1) Nach Diätfehler während der Weihnachtstage.

Tab. 2
Cholesterinester im Serum bei idiopathischer Hypercholesterinämie
(in Prozenten der gesamten Ester)

Fall	GF ¹⁾	MF ¹⁾	DF ¹⁾	TF ¹⁾	PF ¹⁾	Gesamt- cholesterin mg%	Freies Cholesterin mg%	Ester- quotient
So., 48 Jahre ♂	15,8	24,3	46,6	12,6	1,2	764	258	66
Po., 64 Jahre ♂	13,6	22,7	43,5	18,6 ²⁾	1,6	364	103	69
Wa., 47 Jahre ♀	17,5	23,2	44,6	12,7	2,7	428	131	69
Br., 56 Jahre ♀	16,4	24,3	45,5	12,7	1,1	455	128	72
Rö., 53 Jahre ♀	17,2	23,8	37,3	18,3 ²⁾	3,4	452	133	70
Lu., 21 Jahre ♀	17,2	22,6	41,7	16,6	1,8	652	206	68
Mittelwerte der Normalwerte beim Erwachsenen (n = 14)	16,1	23,6	46,7	11,8	2,0			
Mittlere Abweichung vom Mittelwert	± 0,5	± 0,5	± 0,7	± 0,5	± 0,1			
Streuung der Normalwerte	2,0	1,7	2,4	1,7	0,5			

1) GF: Ester der gesättigten Fettsäuren, MF: der einfach ungesättigten Fettsäuren, DF: der Dienfettsäuren, TF: der Tri- und Tetraen-fettsäuren, PF: der hochungesättigten Fettsäuren.

2) Die Patienten deckten ihren Fettbedarf zum großen Teil aus pflanzlichen Keimölen.

Tab. 3
Cholesterinester des Falles So. (in Prozenten der gesamten Ester) bei gaschromatographischer und dünnschichtchromatographischer
Untersuchung des gleichen Serums; Gesamtcholesterin 455 mg%, Cholesterinester 314 mg%.

	Gaschromatographie			Dünnschichtchromatographie		
	BGP-Säule ¹⁾ % nach Um- rechnung aus Hydrierung (a)	BBP-Säule ²⁾ % direkt berechnet (b)	BGP-Säule % direkt berechnet (c)	Vergleichswerte aus BGP-Säule % $\left(\frac{a+c}{2}\right)$	% Versuch A	% Versuch B
C _{14:0}	1,1	1,0	0,9			
C _{15:0}	0,3	0,3	0,2			
C _{16:0}	13,8	14,7	14,1	14,5	12,8	13,0
C _{16:1}	7,8	9,0	8,0			
C _{17:0}	0,7	1,0	0,4	32,2	28,1	27,4
C _{18:0}	1,1	+	1,1			
C _{18:1}	24,3	24,8	24,3			
C _{18:2}	45,3	42,0	45,3	45,3	45,4	45,3
C _{18:3}	+	1,6	+			
C _{20:4}	5,6	5,1?	5,6	5,6	12,0	12,4
Polyen		0,7+		unbekannt	1,8	1,9

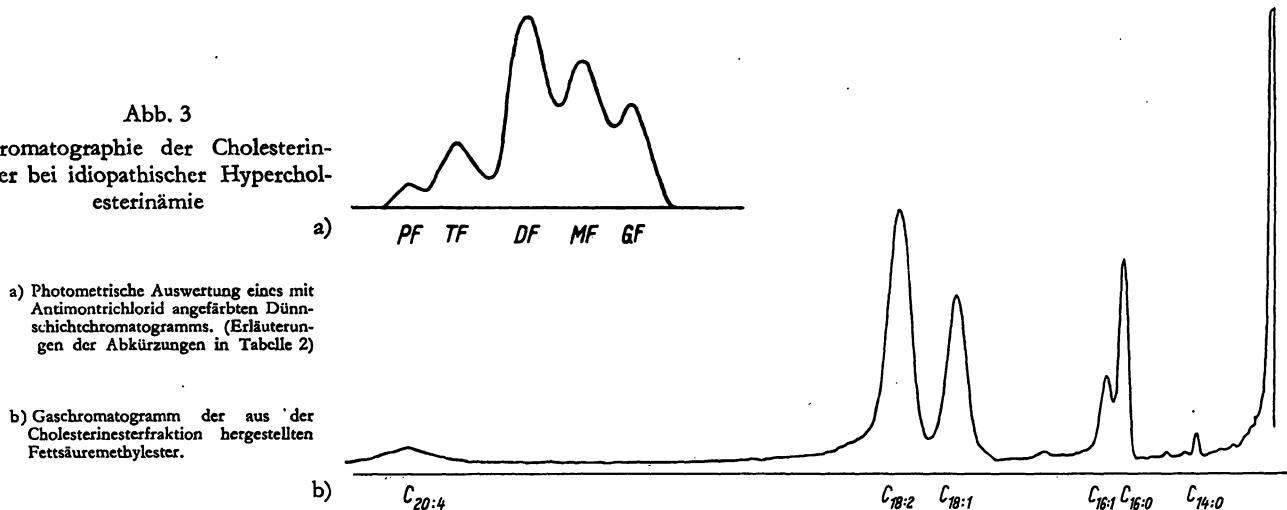
1) BGP = Bernsteinsäure-Äthylenglykol-Polyester

2) BBP = Bernsteinsäure-Butandiol-Polyester

Normalbereich. Eine Ausnahme bildete eine Vermehrung der TF-Fraktion in den Fällen Po. und Rö., die bei Po. auf Kosten aller Fraktionen, bei Rö. in erster Linie auf Kosten der DF-Fraktion ging. Die Vermehrung der Tri- und Tetraensäuren enthaltenden TF-Fraktion erklären wir durch die von den Patienten eingenommene pflanzenölreiche Kost, da sowohl AHRENS u. Mitarb. (23) als neuerdings auch CRAMÉR und BJÖRNTORP (24) gezeigt haben, daß vermehrte Zufuhr hochungesättigter Fettsäuren zur Anhäufung entsprechender Cholesterinester im Serum führt. Wir konnten kürzlich bestätigen, daß Verabreichung von Arachidonsäureäthylester zu

Sonderstellung ein, weil die Lipoidvermehrungen im Plasma nicht auf eine bestimmte Substanz und ihr biochemisch oder strukturell sehr nahestehende Substanzen beschränkt sind, sondern die Vermehrung mehrerer, häufig sogar vieler Lipide festzustellen ist. Um zu zeigen, welche Lipide im einzelnen an den Vermehrungen beteiligt sind, sollten viele Fälle fraktioniert analysiert werden. Wendet man dieses Prinzip auf die idiopathische familiäre Hypercholesterinämie an, so zeigt sich in jedem Fall nicht nur eine Vermehrung des Gesamtcholesterins sondern auch eine Vermehrung der Phosphatide, daneben, bei fettreicher Ernährung, eine

Abb. 3
Chromatographie der Cholesterinester bei idiopathischer Hypercholesterinämie



einer Vermehrung der Arachidonsäureester des Cholesterins im Plasma führt. Unsere Befunde einer normalen Esterverteilung bei idiopathischer Hypercholesterinämie stehen in Widerspruch zu Angaben von SCHRADE und Mitarb. (25), die auf Grund gaschromatographischer Analysen bei „idiopathischer Hyperlipidämie“ eine deutliche relative Verminderung der Linolsäureester und der Ester der hochungesättigten Fettsäuren, dagegen eine relative Vermehrung der Ester von Palmitin-, Palmitolein- und Ölsäure festgestellt haben. Um diesen Widerspruch aufzuklären, haben wir in einem zuverlässig frischen Serum eines diagnostisch eindeutigen Falles von idiopathischer, xanthomatöser Hypercholesterinämie nach längerem Absetzen jeglicher Therapie (Fall So.) die Fettsäuren der Cholesterinester gaschromatographisch getrennt und bestimmt. Abbildung 3 gibt Dünnschicht- und Gaschromatogramme nebeneinander wieder. In Tabelle 3 sind die quantitativen Auswertungen einander gegenübergestellt. Die Befunde zeigen, daß die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme in allen entscheidenden Punkten mit den Ergebnissen der Gaschromatographie übereinstimmt und bestätigen damit die Richtigkeit der dünnschichtchromatographischen Analyse. (Die Gegenüberstellung der Auswertungen verschiedener Gaschromatographien zeigt außerdem die auch dieser Methode innewohnende Fehlerbreite).

Diskussion

Unter den angeborenen Stoffwechseldefekten nehmen die Störungen des Stoffwechsels der Plasmalipide eine

Vermehrung der Neutralfette und bei reichlicher Zufuhr von Carotinene auch eine Hypercarotinämie.

Das Verhalten der Carotine als ausschließlich exogener Lipide beweist, daß beim Anstieg der Lipoidspiegel Löslichkeitsphänomene im Spiele sind, wenn man nicht die abwegige Annahme machen will, daß ein allen Lipiden gemeinsames abbauendes Enzym fehlt. Löslichkeitsphänomene, die in der Struktur der Lipoproteine eine Rolle spielen (26), sind vermutlich auch dafür verantwortlich, daß Cholesterin und Phosphatide, von seltenen Ausnahmen abgesehen, sich im Plasma gleichsinnig verhalten, und daß es selbst unter experimentellen Bedingungen nicht gelingt, eine isolierte Vermehrung oder Verminderung einer der beiden Substanzgruppen hervorzurufen. So führt Cholesterinfütterung des Kaninchens zu einem Anstieg der Phosphatide (27); durch Infusion von Phosphatiden kann man einen Anstieg des Cholesterins erreichen (28). Dementsprechend ist auch zu erwarten, daß die isolierte Störung des Stoffwechsels eines Plasmalipoides zu einer Anhäufung der anderen führt, so daß sich die Notwendigkeit ergibt, den Stoffwechsel aller Plasmalipide entsprechend zu untersuchen.

Unsere Befunde zeigen, daß bei der idiopathischen Hypercholesterinämie die relative Zusammensetzung der Cholesterinester normal ist, daß also alle Cholesterinester an der Zunahme des Gesamtcholesterins in gleicher Weise beteiligt sind. Damit wird die isolierte Störung des Stoffwechsels eines Cholesterinesters als Ursache der Hypercholesterinämie unwahrscheinlich. Da auch der

Cholesterinesterquotient bei dieser Krankheit normal ist, kommt auch eine Störung der gesamten Esterbildung bzw. Esterspaltung als der der Hypercholesterinämie eigentümliche biochemische Grundeffekt nicht in Frage. Auch auf Grund von Messungen des Plasma-cholesterinumsatzes (29) ist es wenig wahrscheinlich, daß der primäre Defekt Stoffwechselreaktionen betrifft, die an Synthese oder Abbau der Plasmacholesterine beteiligt sind.

Für eine Erörterung weiterer, hier nicht geprüfter pathogenetischer Möglichkeiten darf auf kürzlich an anderer Stelle mitgeteilte Zusammenfassungen (30, 31) verwiesen werden.

Abschließend scheint eine Bemerkung über die chemische Diagnose der idiopathischen Hypercholesterinämie angebracht. Die Literatur der neueren Zeit gibt häufig an, daß die Neutralfettvermehrung Ausmaße erreichen kann, durch die das Serum leicht trüb, gelegentlich sogar stark getrübt erscheint. Manchmal sind solche

Fälle als idiopathische Hyperlipämie diagnostiziert worden. Im allgemeinen erreicht aber die Neutralfettvermehrung bei der idiopathischen Hypercholesterinämie nicht das gleiche Ausmaß wie bei der idiopathischen Hyperlipämie; in Zweifelsfällen muß die Relation zu dem jeweiligen Cholesterinspiegel berücksichtigt werden (2, 31). Wird durch eine fettarme Diät der Neutralfettspiegel gesenkt, dann bleiben bei der idiopathischen Hypercholesterinämie fast immer deutlich erhöhte Cholesterinspiegel bestehen, während bei der idiopathischen Hyperlipämie die Cholesterinspiegel eher als die Neutralfettspiegel den Normbereich erreichen. Wird auch das klinische Bild zur Diagnose herangezogen, so besteht ohnehin meist kein Zweifel an der nosologischen Zuordnung. Lediglich Fälle, die zufällig durch die Aufdeckung chemischer Veränderungen gefunden werden, bieten die geschilderten diagnostischen Schwierigkeiten, die zeigen, daß manchmal nur der chemische Längsschnitt eine sichere Abgrenzung erlaubt.

Literatur

1. THANNHAUSER, S. J. und H. MAGENDANTZ, *Ann. intern. Med.* 11, 1662 (1938). — 2. THANNHAUSER, S. J., *Lipidoses*. 3. Auflage. Grune & Stratton, New York—London; (1958). — 3. FREDRICKSON, D. S., *Essential familial hyperlipidemia*. In: *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw Hill, New York—Toronto—London, (1960). — 4. ZÖLLNER, N., *Stoffwechsel der Steroide und Carotinoide*. In: *Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten*; Thieme, Stuttgart (1957). — 5. SCHETTLER, G., *Lipidosen*. In: *Handbuch der Inneren Medizin*, Bd. VII, 2. Teil. Berlin—Göttingen—Heidelberg, Springer (1955). — 6. ZÖLLNER, N., *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* 64, 153 (1958). — 7. SPERRY, W. M., *Lipide Analysis*. In: *Methods of Biochemical Analysis*, Bd. II, Interscience Pub. New York—London, (1955). — 8. ZAK, B., R. C. DICKENMAN, E. G. WHITE, H. BURNETT und P. J. CHERNEY, *Amer. J. Clin. Path.* 24, 1307 (1954). — 9. ZLATKIS, A., B. ZAK und A. J. BOYLE, *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 41, 486 (1953). — 10. BARTLETT, G. R., *J. Biol. Chemistry* 234, 466 (1959). — 11. RAPPORT, M. M. und N. ALONZO, *J. Biol. Chemistry* 217, 193 (1955). — 12. CHABROL, E. und R. CHARONNAT, *Presse méd.*, Paris 45, 1713 (1937). — 13. CHABROL, E., M. BÖSZÖRMENYI und P. FALLOT, *Sém. Hôp. Paris* 25, 3446 (1949). — ZÖLLNER, N. und K. KIRSCH, *Zschr. ges. exper. Med.* 135, 545 (1962). — 15. ZÖLLNER, N., *Lipoidstoffwechsel*. In: *Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten*. Thieme, Stuttgart, 1957. — 16. EGGSTEIN, M., *Medizin und Ernährung* 2, 1 (1961). — 17. ZÖLLNER, N., K. KIRSCH und G. AMIN, *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* 66, 677 (1960). — 18. ZÖLLNER, N., G. WOLFRAM und G. AMIN, *Klin. Wschr.* 40, 273 (1962). — 19. ZÖLLNER, N. und G. WOLFRAM, *Klin. Wschr.* 40, 1098 u. 1101 (1962). — 20. CARROLL, K. K., *J. Lipid Research* 2, 135 (1961). — 21. LIPSKY, S. R., A. HAAVIK, C. L. HOPPER und R. W. MCDIVITT, *J. Clin. Invest.* 36, 234 (1957). — 22. CRAIG, B. M. und N. L. MURTY, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 36, 549 (1959). — 23. AHRENS, E. H., jr., W. INSULL, jr., J. HIRSCH, W. STOFFEL, M. K. PETERSON, J. E. FARQUHAR, T. MILLER und H. S. THOMASSON, *Lancet* I, 115 (1959). — 24. CRAMÉR, K. und P. BJÖRNTORP, *Acta med. Scand.* 171, 441 (1962). — 25. SCHRADER, W., R. BIEGLER und E. BÖHLE, *J. Atheroscler. Res.* 1, 47 (1961). — 26. ZÖLLNER, N., *Dtsch. med. Wschr.* 83, 448 (1958). — 27. ZÖLLNER, N., *Pathologie-Biologie* 7, 163 (1959). — 28. BYERS, S. C. und N. FRIEDMAN, *Amer. J. Physiol.* 193, 435 (1958). — 29. HELLMAN, L., R. S. ROSENFELD, M. L. EDINOFF, D. K. FUKUSHIMA, T. F. GALLAGHER, C. I. WANG und D. ADLERSBERG, *J. Clin. Invest.* 34, 48 (1955). — 30. ZÖLLNER, N., *Mtschr. Kinderheilk.* 110, 148 (1962). — 31. ZÖLLNER, N., *Störungen des Fettstoffwechsels. Glycerinlipidosen und Cholesterinosen*. In: *Erbliche Stoffwechselstörungen*, Urban & Schwarzenberg, München, (1962).

Prof. Dr. med. NEPOMUK ZÖLLNER
Medizinische Poliklinik der Universität München
8 München 15, Pettenkoferstr. 8a